

University of Groningen

Eiwitsynthese in een celvrij leversysteem

Ab, Geert

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1968

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Ab, G. (1968). *Eiwitsynthese in een celvrij leversysteem*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

INLEIDING

De genetische informatie wordt van het DNA naar het eiwit overgedragen door een speciaal ribonucleïnezuur, messenger-RNA genaamd. Deze voorstelling is algemeen aanvaard.

De messenger is ontdekt bij het onderzoek over de vermenigvuldiging van een bacteriofaag in een bacterie. Daarna is het bestaan van messengers ook in niet-geïnfecteerde bacteriën aannemelijk gemaakt. Men moet redelijkerwijs aannemen dat het proces van de eiwitsynthese bij dierlijke organismen niet fundamenteel anders zal zijn. Directe bewijzen voor het bestaan van messengers in dierlijke organismen zijn er echter niet. Er bestaat geen methode messengers in vitro op hun functionele activiteit te testen en daarmee hun hoeveelheid te bepalen. Dit is ook de grote handicap bij het onderzoek naar de regulering van de eiwitsynthese. De regulering zal óf op de hoeveelheid óf op de vertaling van de messenger aangrijpen.

Het doel van ons onderzoek was een systeem te ontwikkelen waarin RNA's van hogere organismen op hun messengeractiviteit konden worden getest. Toen wij met ons onderzoek begonnen was er al een analoog systeem uit *Escherichia coli* in gebruik. Slechts in één geval - met het RNA van een bacteriofaag als messenger - was bewezen dat het systeem bruikbaar was.

Daar het niet zeker was, en nog steeds niet zeker is, of messengers van hogere organismen wel in dit bacteriële systeem kunnen werken, leek het ons zinvol om te onderzoeken of er een dergelijk systeem uit een dierlijk organisme was te isoleren. We kozen daarvoor een orgaan met een hoge eiwitsynthese, namelijk (ratte)lever. Onze eerdere pogingen met pancreas waren mislukt tengevolge van het hoge gehalte aan ribonuclease en andere hydrolytische enzymen van dit orgaan.

In het eerste hoofdstuk zal de huidige kennis van het mechanisme van de eiwitsynthese worden besproken. Het geeft een overzicht van de verschillende componenten en processen die bij de vertaling van messenger-RNA in eiwit een rol spelen.

In het tweede hoofdstuk zal een overzicht worden gegeven van de vorderingen die door anderen zijn gemaakt bij het onderzoek naar bacteriële en dierlijke systemen, die kunnen dienen om messenger-RNA's op hun functionele activiteit te testen. Verder zal in dit hoofdstuk aandacht worden ge-

schonken aan de speciale omstandigheden die gelden voor de eiwitsynthese in lever.

In hoofdstuk III worden de methoden besproken die wij bij de isolering en analyse van de subcellulaire systemen uit lever en *E. coli* hebben gebruikt. Verder worden hier de methoden volgens welke de toegepaste RNA's zijn geïsoleerd en de methodiek van de incorporatie van radioactieve aminozuren beschreven.

In hoofdstuk IV wordt het onderzoek naar de eigenschappen van de post-microsomale fractie uit lever, waarop ons aminozuur-incorporerend systeem is gebaseerd, behandeld.

In hoofdstuk V tenslotte worden de ontwikkeling en de eigenschappen van het door ons gebruikte systeem voor eiwitsynthese besproken.

SUMMARY

The final criterion of the messenger RNA character of an RNA is its ability to direct the synthesis of specific proteins. It should program a cell-free system which by itself does not possess the information to make these proteins, e.g. a heterologous system. Such a system has been developed from *Escherichia coli*. In view of the differences between procaryotic and eucaryotic organisms we tried to obtain a similar system from mammalian tissue. This thesis comprises the development of a ribosomal system from rat liver. The effects of various RNA's on its protein synthesizing activity are described.

The ribosomes of the subcellular system should meet the two requirements: they should have low endogenous activity, i.e. should lack messenger RNA. Furthermore, they should have a high response to added mRNA. Therefore the light subfraction of the free - non-membrane bound - ribosomes was chosen. This subfraction is present in the (post-microsomal) supernatant after the centrifugation step, which sediments microsomes and free polysomes. By lowering the pH of this supernatant to 5.1, these ribosomes precipitate together with sRNA and a large amount of protein. This easy and rapid method furnishes a preparation which contains all factors involved in protein synthesis. However it does not incorporate amino acids, unless RNA is added.

The synthetic messenger polyuridylic acid stimulates the incorporation of phenylalanine to a value of 3 nanomoles per nanomole ribosomes.

As specimen of a natural mRNA the RNA from turnip yellow mosaic virus was used. Upon addition of this RNA to our system, the amino acid incorporation (in terms of nanomoles leucine per nanomole ribosomes) increases from 0.3 to 1.5-2.5. This value was obtained after the optimal incorporation conditions had been determined. The system with TYMV-RNA has the following properties:

1. The optimal Mg^{++} -concentration is 3-4 mM which is low compared to that found with poly (U), viz. 8-12 mM.
2. The incorporation is dependent on an energy supply.
3. The incorporation stops already at about 10 minutes.
4. Less than 10% of the incorporated leucine is in an N-terminal position as determined by the fluorodinitrobenzene method. Thus, the incorporation represents real protein synthesis.
5. When the ribosomes were omitted the incorporation was

negligible, either in the absence or presence of TYMV-RNA. After subfractionation of the ribosomal preparation the monomers and dimers were shown to be the active particles. The subunits of the ribosomes are inactive whether separate or mixed.

6. The labelled peptide chains are not released from the ribosomes. The attachment to the ribosomal particles is, at least partly, due to linkage to RNA, probably tRNA.

TYMV-RNA and poly (U) differ not only in their optimal Mg^{++} -concentration but also in another respect. Removal of low molecular weight components from the subcellular preparation results in a serious loss of the response to TYMV-RNA whereas the stimulation by poly (U) is hardly affected. Reconstitution failed to restore the response to TYMV-RNA; apparently a factor specifically involved in the translation of TYMV-RNA is decomposed during gelfiltration or dialysis. The differences between TYMV-RNA and poly (U) may indicate special requirements for chain initiation with natural messengers.

So far TYMV-RNA is the only natural messenger that causes a reproducible stimulation of protein synthesis in our system. Unfortunately, the RNA of the bacteriophage MS2, whose product would have been identifiable, was entirely inactive. Several RNA fractions from chicken liver resulted in only a low level of amino acid incorporation.

Direct identification of TYMV proteins is unfeasible. We therefore tried to get indirect evidence of TYMV coat protein formation by determining the ratios in which different amino acids are incorporated. We found that this method could not be applied to our system because of the large differences in the rate of charging of different tRNA's, and the short duration of protein synthesis.

Comparison of our system with other liver systems shows that post-microsomal ribosomes are superior to polysomes and microsomes as well in their lack of endogenous activity, as in their response to poly (U) and TYMV-RNA.